

### **BAB III. METODE PENELITIAN**

#### **1.1. Tempat dan Waktu**

Waktu Penelitian dilaksanakan pada bulan Februari – Juni 2016. Tempat pelaksanaan penelitian di Laboratorium Mitra Anggrek Indonesia (MAI) Jl. Hasanudin 1 No 24 Kecamatan Junrejo, Kota Batu.

#### **1.2. Alat dan Bahan**

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah autoclave, LAFC, gelas ukur, gelas erlenmeyer, botol kultur, pinset, cawan petri, Bunsen, korek api, scalpel, timbangan analitik, spatula, pipet ukur, kompor gas, rak kultur, lampu LED, pisau, *airconditioner* (AC), kertas saring, karet gelang, virus doctor.

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah 6 kultivar apel Fuji, Washington, Ambrossia, USA Cery, Rome Beauty, Manalagi, sitokinin (BAP), auksin (NAA), alkohol, chlorox, media Murashige & Skoog (MS), formalin, spirtus, fungisida, bakterisida, air steril.

#### **1.3. Metode Penelitian**

Pelaksanaan penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktorial dengan 2 faktor. Faktor pertama yaitu kombinasi ZPT dengan 4 taraf; (B0) 0 ppm BAP + 0 ppm NAA, (B1) 3 ppm BAP + 0,1 NAA, (B2) 4 ppm BAP + 0,2 NAA, (B3) 5 ppm BAP + 0,3 NAA. Faktor kedua yaitu 6 Varietas Apel dengan 6 taraf; (V1) Fuji, (V2) USA Cherry, (V3) Ambrossia (V4) Washington, (V5)

Manalagi, (V6) Romebeauty. Sehingga didapat 24 kombinasi perlakuan, diulang sebanyak 3 kali. Data yang di dapat di analisis ragam.

#### Denah Percobaan

|                   |                   |                   |                   |
|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| <b>B2V5 (III)</b> | <b>B0V2 (I)</b>   | <b>B2V3 (III)</b> | <b>B0V3 (III)</b> |
| <b>B1V3 (I)</b>   | <b>B2V3 (II)</b>  | <b>B2V4 (I)</b>   | <b>B2V2 (I)</b>   |
| <b>B0V6 (III)</b> | <b>B3V5 (III)</b> | <b>B2V1 (III)</b> | <b>B1V1 (II)</b>  |
| <b>B3V2 (II)</b>  | <b>B1V5 (II)</b>  | <b>B2V1 (II)</b>  | <b>B1V4 (III)</b> |
| <b>B3V1 (II)</b>  | <b>B0V6 (II)</b>  | <b>B0V4 (I)</b>   | <b>B0V5 (III)</b> |
| <b>B3V1 (III)</b> | <b>B1V1 (III)</b> | <b>B3V3 (II)</b>  | <b>B2V5 (I)</b>   |
| <b>B2V6 (II)</b>  | <b>B3V4 (I)</b>   | <b>B0V3 (II)</b>  | <b>B0V1 (III)</b> |
| <b>B0V2 (II)</b>  | <b>B1V1 (I)</b>   | <b>B0V4 (III)</b> | <b>B0V5 (II)</b>  |
| <b>B0V3 (I)</b>   | <b>B2V4 (III)</b> | <b>B0V2 (III)</b> | <b>B0V4 (II)</b>  |
| <b>B1V3 (III)</b> | <b>B1V4 (II)</b>  | <b>B3V5 (I)</b>   | <b>B1V5 (I)</b>   |
| <b>B1V6 (III)</b> | <b>B1V6 (II)</b>  | <b>B2V3 (I)</b>   | <b>B3V3 (III)</b> |
| <b>B3V1 (I)</b>   | <b>B3V2 (I)</b>   | <b>B3V3 (I)</b>   | <b>B2V5 (II)</b>  |
| <b>B2V2 (III)</b> | <b>B1V2 (I)</b>   | <b>B1V2 (II)</b>  | <b>B3V6 (III)</b> |
| <b>B3V2 (III)</b> | <b>B2V6 (III)</b> | <b>B0V1 (I)</b>   | <b>B3V5 (II)</b>  |
| <b>B2V1 (I)</b>   | <b>B2V4 (II)</b>  | <b>B1V2 (III)</b> | <b>B1V4 (I)</b>   |
| <b>B3V4 (II)</b>  | <b>B0V6 (I)</b>   | <b>B3V6 (II)</b>  | <b>B2V2 (II)</b>  |
| <b>B0V5 (I)</b>   | <b>B0V1 (II)</b>  | <b>B2V6 (I)</b>   | <b>B1V6 (I)</b>   |
| <b>B1V3 (II)</b>  | <b>B3V4 (III)</b> | <b>B1V5 (III)</b> | <b>B3V6 (I)</b>   |

#### 1.4. Teknik Pelaksanaan

##### 1.4.1. Pembuatan Media

**Tabel.2 Komposisi Media Murashige dan Skoog**

| Komposisi  | Volume mg/liter |
|--|-----------------|
| <b>Makro</b>                                       |                 |
| NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>                    | 1650 mg         |
| CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O                | 440 mg          |
| KI   | 0,83            |
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                     | 6,2 mg          |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                    | 170 mg          |
| KNO <sub>3</sub>                                   | 1900 mg         |
| <b>Mikro</b>                                       |                 |
| MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O                | 370 mg          |
| MnSO <sub>4</sub> 4H <sub>2</sub> O                | 22,3 mg         |
| ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O                | 8,6 mg          |
| Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O | 0,25 mg         |
| CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O                | 0,025 mg        |
| Triplex  | 46 mg           |
| CoCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O                | 0,025 mg        |
| <b>Vitamin</b>                                     |                 |
| Myo-Inositol                                       | 100 mg          |
| Pyridoxin  | 0,5 mg          |
| Nicotinic Acid                                     | 0,5 mg          |
| Thiamine   | 0,4 mg          |

Menimbang semua bahan yang di gunakan sesuai dengan kebutuhan yang di butuhkan. Setelah semua bahan di timbang sesuai dengan yang di butuhkan, di masukan ke dalam wadah ber-volume 1000 ml satu persatu. Menambahkan aquadest

hingga mencapai 1000 ml. Menambahkan sukrosa kemudian diaduk hingga rata. Mengukur pH dilakukan sebelum larutan dimasak dan semua bahan sudah tercampur pH yang sesuai dalam pembuatan media berkisar 5,6 -5,8. Memasak larutan media hingga mendidih dan di tambahkan agar secara perlahan agar tidak tergumpal. Setelah mendidih, di matikan api kemudian di masukan ke dalam botol media secara perlahan dengan ukuran yang di butuhkan. Setelah semua terisi media, di tutup dengan plastik hingga rapat dengan karet sebanyak 2-3 kali putaran dengan tujuan meminimalisir bakteri dan cendawan masuk melalui ujung botol media. Setelah semua tertutup dengan plastik botol-botol media di sterilisasi ke dalam autoclave dengan tekanan 10psi selama 10 menit. Setelah 10 menit di tunggu hingga tekanan menurun 0 psi, botol-botol media di keluarkan dan di taruh pada rak-rak kultur.

#### **3.4.2. Sterilisasi Alat**

Dalam pelaksanaan penelitian kultur jaringan *in-vitro* apel sebelum memulai pelaksanaan semua alat yang di gunakan harus di cuci dan di sterilkan dalam autoclave pada tekanan 17 psi selama 20 menit

#### **3.4.3. Sterilisasi Bahan Tanam**

Bahan tanam yang digunakan pada penelitian ini adalah biji buah apel dari 6 kultivar yang berbeda-beda. Sterilisasi bahan tanam (eksplan) adalah sebagai berikut:

1. Mencuci bersih buah apel terutama pada bagian ujung buah
2. Membilas buah apel dengan air mengalir
3. Memotong buah apel di empat sisi hingga disisakan bagian tengah

4. Merendam buah apel ke dalam larutan fungisida dan bakterisida selama 30 menit dan di aduk terus menerus
5. Merendam buah apel kedalam larutan chlorox 15% selama 15 menit
6. Merendam buah apel ke dalam larutan chlorox 5% selama 10 menit (di dalam LAFC)
7. Membilas buah apel dengan air steril sebanyak 3 kali

#### **3.4.4. Inokulasi Embrio Apel**

Penanaman dilakukan dengan cara sebagai berikut;

1. Mencilupkan daging buah apel ke dalam alkohol
2. Membakar pinset, scalpel, daging buah apel pada bunsen merata ke semua bagian
3. Memotong bagian samping buah hingga menyisakan biji buah apel
4. Biji apel di bakar kembali dengan mencelupkan ke dalam alcohol 96%
5. Memotong biji apel menjadi dua bagian yaitu bagian atas dan bagian bawah
6. Menanam bagian atas ke dalam media
7. Menutup dengan plastik dan ditali dengan karet hingga rapat
8. Memberi keterangan pada label
9. Menaruh botol media berisi eksplan ke rak kultur

### 3.5. Tahapan Percobaan I

Tahapan percobaan ke 1 eksplan yang sudah ditanam dikecambahkan pada media A1 yang satu botol berisi 3 eksplan selama 36 HSI . Media A1 merupakan media modifikasi MS0 dengan penambahan 1,5 ppm BAP + 0,2 ppm NAA + 0,1 ppm GA3.

#### 3.5.1. Tahapan Percobaan II

Tahapan percobaan ke 2 eksplan yang sudah dikecambahkan selama 36 HSI di media A1 kemudian di sub kultur pada media perlakuan.

### 3.6. Variabel Pengamatan

#### 3.6.1. Pengamatan Percobaan I

Pengamatan dilakukan pada saat bahan tanam sudah ditanam pada media A1 dengan parameter antara lain:

1. **Waktu Pecah biji.** Mengamati awal mula eksplan mengalami pecah biji.
2. **Muncul Radikule.** Mengamati awal mula eksplan muncul radikule ditandai dengan munculnya radikule (calon akar).
3. **Biji Normal dan Abnormal.** Menghitung rata-rata persentase biji normal dan abnormal (kriteria biji normal ditandai dengan semua bagian organ biji yang lengkap seperti epikotil, hipokotil, akar, tunas. Kriteria biji abnormal ditandai dengan kurang lengkapnya salah satu organ biji).

### 3.6.2. Pengamatan Percobaan II

Pengamatan pada percobaan 2 meliputi;

1. **Jumlah daun.** Menghitung jumlah daun yang sudah membuka sempurna.
2. **Jumlah tunas.** Menghitung jumlah tunas pada bagian atas kotiledon.



